

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-114661

⑤ Int.Cl.<sup>5</sup>  
A 61 M 1/36

識別記号  
3 3 3  
3 3 0

庁内整理番号  
7180-4C  
7180-4C

④ 公開 平成4年(1992)4月15日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑥ 発明の名称 バイロジェン吸着剤及びそれを用いたバイロジェンの除去方法

② 特 願 平2-232542

② 出 願 平2(1990)9月4日

⑦ 発 明 者 下 村 泰 志 千葉県市原市五井南海岸8番の1 宇部興産株式会社千葉  
研究所内

⑦ 発 明 者 斉 野 猛 司 千葉県市原市五井南海岸8番の1 宇部興産株式会社千葉  
研究所内

⑦ 発 明 者 鶴 納 英 樹 千葉県市原市五井南海岸8番の1 宇部興産株式会社千葉  
研究所内

⑦ 出 願 人 宇部興産株式会社 山口県宇部市西本町1丁目12番32号

## 明 細 書

### 1. 発明の名称

バイロジェン吸着剤及びそれを用いたバイロジェンの除去方法

### 2. 特許請求の範囲

(1) 水酸基を有する高分子化合物に、2個以上のイソシアネート基を有するイソシアネート化合物を結合させた、

バイロジェン吸着剤。

(2) 特許請求の範囲第1項に記載のバイロジェン吸着剤にバイロジェンを吸着させる、

バイロジェンの吸着除去方法

### 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、バイロジェン吸着剤に関する。又、患者の血液や血漿等の体液、インターフェロン等の薬剤、或いは血液浄化器等の医療機器中の充填液等にこのバイロジェン吸着剤を接触させるバイロジェンの吸着除去方法に関する。

(従来の技術及びその問題点)

バイロジェンは、インターフェロンやTNF、SOD等の生物体や生体成分由来の薬剤、或いは血液浄化器や透析器、血漿分離器等の医療機器の充填液等にしばしば含まれることがあり、患者の発熱等の事故の原因となっている。又、バイロジェンであるEndotoxinがMOF(多臓器不全)に伴うDIC(汎発性血管内凝固症候群)や敗血症の原因物質であることも知られている。

バイロジェンの中で最も発熱に関与する物質は細菌性のものであり、一般に外毒素(Exotoxin)と内毒素(Endotoxin)とに分けられる。これらの内、グラム陰性菌の細胞壁脂質多糖体(Lipopolysaccharide、LPS)を主とする内毒素が最も発熱性が強力である。

従って、血液浄化器等の医療機器の充填液等やインターフェロン等の薬剤へのバイロジェン混入防止のために、製造工程において無菌的な取扱が強く要求される。しかし、現実にはグラム陰性菌

の混入、及びその結果としてのバイロジェンによる汚染はしばしば起っている。そして、一度、薬剤や医療機器がバイロジェンで汚染されると、通常の滅菌操作では患者の発熱を防止できない。なぜなら、バイロジェンは生物体ではなく化学物質であるので通常の滅菌操作では無毒化できないからである。バイロジェンの化学構造を熱的に破壊するには通常250℃以上に加熱することが必要であるが、薬剤や医療機器等についてこのような操作を行うことは現実にはとても不可能である。

このため、従来は、逆浸透膜や限外濾過膜による濾過や、ヒスチジンやポリミキシンB等のバイロジェンと親和性の高いリガンドを固定化したバイロジェン吸着剤による吸着除去により、バイロジェンを除去していた。

しかし、注射水や低分子量の薬剤は、逆浸透膜や限外濾過膜で濾過してバイロジェンを除くことができるが、血液や血漿については困難である。又、TNFやSOD等の薬剤を実験室レベルのスケールで試験製造する場合等、サンプルが少量の

場合も、これらの膜による精製が困難である。

一方、バイロジェン吸着剤を用いる方法により、血液や血漿、或いは少量のサンプルのバイロジェン除去は容易に行える。しかし、従来はバイロジェン吸着剤そのものが十分な吸着性能や吸着選択性を有していないという問題があった。又、リガンドを担体に固定したタイプのバイロジェン吸着剤を用いる場合は、リガンドが吸着剤から脱落して患者の体内に流出することにより、患者が重篤な免疫反応を起こす虞れがある等、安全性の面からも問題があった。

〔本発明の解決すべき課題〕

本発明は、吸着選択性、吸着速度に優れ、且つリガンドを使用しないバイロジェン吸着剤を提供することを目的とする。

又、血液等の体液、SOD等の生物体や生体成分由来の薬剤、或いは血液浄化器等の医療機器の充填液等を上記の吸着剤に接触させてバイロジェンを吸着除去する方法を提供することも、目的とする。

〔課題解決のための技術的手段〕

本発明のバイロジェン吸着剤は、アガロースのような水酸基を有する高分子化合物に、2個以上のイソシアネート基を有するイソシアネート化合物を結合させたものである。

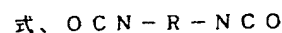
水酸基を有する高分子化合物は、水に不溶のものであれば如何なるものでもよいが、殊に好ましいのは、アガロース、セルロース、デキストラン、ポリエチレングリコール等である。これらは単独でも2種以上の混合物としても用いられる。又、これらの化合物の架橋物も好ましい。

これらの化合物の形状は、粒子状、繊維状、膜状、中空糸状、チューブラー状、等、特に制限はない。しかし、イソシアネート化合物と反応させるのに好都合な点、及びイソシアネート化合物と反応させて得られる吸着剤の取扱が容易な点で、粒子状や繊維状のものが好ましい。

粒子状の場合は、得られる吸着剤が、カラムに充填した際に目詰まりしにくく且つバイロジェンの吸着速度が高い点から、直径20～5000μ

m、より好ましくは20～1000μmの球状が好ましい。

イソシアネート化合物は、分子中に2個以上のイソシアネート基を有するものであればよい。このようなイソシアネート化合物の例としては、例えば、



(Rは炭素数1～12の脂肪族鎖、又は炭素数6～15の芳香族鎖を表す)で示される二官能性イソシアネートの他、三官能性以上の多官能性イソシアネートが挙げられる。

二官能性イソシアネートとしては、具体的にはヘキサメチレンジイソシアネート、テトラメチレンジイソシアネート、オトリジンイソシアネート、トリレンジイソシアネート、ナフチレン-1,5-ジイソシアネート、4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネート等が挙げられる。

又、三官能性イソシアネートとしては、例えばトリフェニルメタン4,4',4"-トリイソシアネート、1,3,5-トリイソシアネート-2-

メチルベンゼン、1, 3, 6-ヘキサメチレントリイソシアネート、1, 3, 5-トリス(6-ヒドロキシヘキシル)トリイソシアネートが挙げられる。

これらの化合物の中では、ヘキサネチレンジイソシアネートが、得られる吸着剤の吸着活性が特に高い点で最も好ましい。

本発明のバイロジェン吸着剤は、例えば次のようにして製造することができる。

水酸基を有する高分子化合物は、乾燥状態のものを使用することがこのましい。もし、これらの化合物が水分を含有する場合は、通常的手段により乾燥するか、又は無水有機溶媒で置換処理を繰り返せばよい。置換に用いる有機溶媒は、イソシアネート化合物との反応に用いる溶媒と同一の物であればよく、例えば、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン等を挙げることができる。

最も簡便な方法としては、例えば患者の血液を体外に導き出して血液バッグに貯め、これに本発明のバイロジェン吸着剤を混合してバイロジェンを吸着除去したのち、フィルターで吸着剤を除去して血液を患者の体に戻す方法がある。この方法は複雑な装置を必要としない点で好ましい。

又、他の方法には、バイロジェン吸着剤をカラムに充填したものを体外循環回路に組み込み、オンラインでバイロジェンを吸着除去する方法などがある。体外循環回路には全血を循環させてもよいし、血漿のみを循環させてもよい。

インターフェロンやSOD、TNF等の薬剤からバイロジェンを除去する方法としては、例えばこれらの薬剤の粗製品を本発明のバイロジェン吸着剤と混合してバイロジェンを吸着除去し、フィルターで吸着剤を除去する方法がある。この方法は複雑な装置を必要としない点で好ましい。

又、他の方法には、バイロジェン吸着剤をカラムに充填したものにこれらの薬剤の粗製品を通してバイロジェンを吸着除去する方法などもある。

イソシアネート化合物との反応は次のようにして行う。即ち、水酸基を有するアガロース等の高分子化合物を上記の有機溶媒に懸濁させ、イソシアネート化合物を加え、10～200℃、好ましくは30℃～110℃で攪拌して反応させる。水酸基を有する高分子化合物とイソシアネート化合物の割合は特に制限はないが、当該高分子化合物中の水酸基(—OH)とイソシアネート化合物(—NCO)との割合が、 $-NCO/-OH > 1$ となるようにすることが好ましい。反応は全て反応系に水が入らない条件で行う。指定時間攪拌し水酸基とイソシアネート基とが反応した後、得られた吸着剤を有機溶媒で反応物を繰り返し洗浄し、未反応のイソシアネート化合物や副生成物を除去する。次いで、この吸着材を吸引濾過し水で繰り返し洗浄して、有機溶媒を除去する。この吸着剤は通常注射用蒸留水中で無菌状態で保存する。

本発明のバイロジェン吸着剤を用いて、患者の血液や血漿からのバイロジェンを除去するには種々の方法がある。

医療機器の充填液からバイロジェンを除去するには、バイロジェン吸着剤をカラムに充填したものを医療機器の循環回路に組み込み、充填液をカラムを通して循環させる等の方法がある。

#### 〔実施例〕

以下、実施例により、本発明を更に詳しく説明する。

#### バイロジェン吸着剤の製造

架橋アガロース〔商品名セファロースCL-4B(ファルマシア製)〕を蒸留水で繰り返し洗浄し、吸引濾過して水を充分絞り切った。

このウェット状の架橋アガロース10.0g(絶乾状態で0.77g)を脱水したジメチルスルホキシド(DMSO)50ml中に加え、常温で2時間攪拌した。水分の入らない系でDMSOを除去した後、新たに脱水DMSO30mlを加え、常温で1時間攪拌した。以下同様に30ml(12.5時間)、30ml(3時間)の操作を繰り返し、最後にDMSO20mlを加えた。このときの系内のDMSO中の水分量をカールフィッシャー法で分析

すると約10ppmであった。

この系にヘキサメチレンジイソシアネート(HMDI)1.0gを脱水DMSO10mlに加えた溶液を仕込み、100℃で2時間攪拌して反応を行った。反応溶液を除去後、新たなDMSO25mlを仕込み、常温で1.5時間攪拌して洗浄を行った。以後、同様に25ml(1.5時間)、20ml(1.5時間)、20ml(1.5時間)、20ml(1.5時間)、20ml(2.5時間)の条件で順次洗浄した。最後の洗浄液20ml中のイソシアネート基を滴定分析したがイソシアネート基は検出されなかった。その後、水30mlを加えて反応を停止した。反応物を吸引濾過し、DMSO20ml中で室温で一晩攪拌したのち、再び濾取し、大量の水で繰り返し洗浄し、吸着剤を得た。吸着剤の形状はビーズ状であり、平均粒径は55μmであった。この吸着剤を吸引濾過後、注射用蒸留水に浸漬した。

吸着試験は、このバイロジェン吸着剤を吸引濾過により水を絞り切って行った。

#### 実施例1

た。

#### 実施例2

実施例1で使用したバイロジェン吸着剤5.0mlを内径10mmのカラムに充填した。このカラムにバイロジェン溶液(E. Coli 0128:B12、濃度10.0ng/ml)を2.0ml/分の流速で流し、流出液中のバイロジェン濃度を測定した。

その結果を表2に示す。

表2

処理液量 (ml)	流出液中のバイロジェン濃度
10	< 5.0 (pg/ml)
50	< 5.0 (pg/ml)
100	< 5.0 (pg/ml)
500	< 5.0 (pg/ml)
1000	< 5.0 (pg/ml)
1500	< 5.0 (pg/ml)
2000	27.5 (pg/ml)
3000	10000 (pg/ml)

この結果から、カラムに詰めその中にバイロジ

上記の方法で調整したバイロジェン吸着剤0.5ml(乾燥重量0.1g)と、バイロジェン溶液(E. Coli 0128:B12)1.5mlを、パイプレーターで混合した後、37℃で120分間インキュベートした。その後、遠心分離(7000rpm、15分間)し、上澄を採取し、エンドスपीシー法でバイロジェンを定量した。その結果を第1表に示す。

表1

バイロジェン溶液	A	B	C
1	5	< 5.0	100
2	10	< 5.0	100
3	50	< 5.0	100
4	100	< 5.0	100

A: 吸着試験前のバイロジェン濃度 (ng/ml)

B: 吸着試験後のバイロジェン濃度 (pg/ml)

C: 吸着率 (%)

この結果から、濃度100ngと高濃度のバイロジェン溶液においても、本発明のバイロジェン吸着剤はバイロジェンをよく吸着することが、判

エン溶液を通した場合でも、本発明のバイロジェン吸着剤はバイロジェンをよく吸着することが判る。

#### 実施例3

実施例1で使用したバイロジェン吸着剤5.0mlを内径10mmのカラムに充填した。このカラムにバイロジェン溶液(E. Coli 0128:B12、濃度100ng/ml)と人アルブミン溶液(濃度5.0mg/dl)の混合溶液200mlを流通させ、人アルブミンの回収率及びバイロジェンの除去率を測定した。その結果、人アルブミンの回収率は95.2%、バイロジェンの除去率はほぼ100%であった。

このことから、本発明のバイロジェン吸着剤はバイロジェンを殆ど100%吸着するにも係わらず、有用成分のアルブミンは殆ど吸着しないことが判った。

#### 実施例4

実施例1で使用したバイロジェン吸着剤5.0mlを内径10mmのカラムに充填した。このカラムに

バイロジェン溶液 (E. Coli 0128:B12、濃度100 ng/ml) とインシュリン溶液 (濃度2.0 mg/ml) の混合溶液200 mlを流通させ、インシュリンの回収率及びバイロジェンの除去率を測定した。その結果、インシュリンの回収率は99%、バイロジェンの除去率はほぼ100%であった。

このことから、本発明のバイロジェン吸着剤はバイロジェンを殆ど100%吸着するが、有用物質のインシュリンは殆ど吸着しないことが判った。

#### 実施例5

実施例1で使用した吸着剤5.0 mlを内径10 mmのカラムに充填した。このカラムにバイロジェン溶液 (E. Coli 0128:B12、濃度100 ng/ml) とTNF溶液 (濃度1.0 mg/ml) の混合溶液200 mlを流通させ、TNFの回収率及びバイロジェンの除去率を測定した。その結果、TNFの回収率は95%であり、バイロジェンの除去率はほぼ100%であった。

このことから、本発明のバイロジェン吸着剤は

ことが判った。

#### 比較例1

セファロースCL-4B 0.5 mg (乾燥重量0.1 g) と、バイロジェン溶液 (E. Coli 0128:B12) 1.5 mlを、バイブレーターで混合した後、37℃で120分間インキュベートした。その後、遠心分離 (7000 rpm、15分間) し、上澄を採取し、エンドスペースー法でバイロジェンを定量した。その結果を第4表に示す。

表4

バイロジェン溶液	A	B	C
1	5	4.9	2.0
2	10	9.9	1.0
3	50	49.9	0.2
4	100	99.9	0.1

A: 吸着試験前のバイロジェン濃度 (ng/ml)

B: 吸着試験後のバイロジェン濃度 (ng/ml)

C: 吸着率 (%)

バイロジェンを殆ど100%吸着するが、有用物質のTNFは殆ど吸着しないことが判った。

#### 実施例6

実施例1で使用したバイロジェン吸着剤0.5 mlと、バイロジェン高値の患者の血漿1.5 mlをバイブレーターで混合し、37℃で120分間インキュベートした。その後、遠心分離し、その上澄についてエンドスペースー法でバイロジェン濃度を測定した。結果を表3に示す。

表3

患者血漿	A	B	C
1	35	< 5.0	100
2	50	< 5.0	100
3	70	< 5.0	100
4	100	< 5.0	100

A: 吸着試験前のバイロジェン濃度 (ng/ml)

B: 吸着試験後のバイロジェン濃度 (ng/ml)

C: 吸着率 (%)

この結果から、実際にヒト血漿について使用した場合であっても、バイロジェンをよく吸着する

#### 比較例2

比較例1で使用した吸着剤5.0 mlを内径10 mmのカラムに充填した。このカラムにバイロジェン溶液 (E. Coli 0128:B12、濃度100 ng/ml) を2.0 ml/分の流速で流し、流出液中のバイロジェン濃度を測定した。その結果を表5に示す。

表5

処理液量 (ml)	流出液中のバイロジェン濃度
10	99.9 (ng/ml)
50	100 (ng/ml)
100	100 (ng/ml)
500	100 (ng/ml)

#### 比較例3

比較例1で使用した吸着剤5.0 mlを内径10 mmのカラムに充填した。このカラムにバイロジェン溶液 (E. Coli 0128:B12、濃度100 ng/ml) と人アルブミン溶液 (濃度5.0 mg/dl) の混合溶液200 mlを流通させ、人アルブミンの回収率及びバイロジェンの除去率を測定し

た。その結果、人アルブミンの回収率は95.2%であったが、バイロジェンは除去率1.0%と殆ど除去されないことが判った。

#### 比較例4

比較例1で使用した吸着剤5.0 mlを内径10 mmのカラムに充填した。このカラムにバイロジェン溶液(E. Coli 0128:B12、濃度100 ng/ml)とインシュリン溶液(濃度2.0 mg/ml)の混合溶液200 mlを流通させ、インシュリンの回収率及びバイロジェンの除去率を測定した。その結果、インシュリンの回収率は99%であったが、バイロジェンの除去率は1.0%と殆ど除去されないことが判った。

#### 比較例5

比較例1で使用した吸着剤5.0 mlを内径10 mmのカラムに充填した。このカラムにバイロジェン溶液(E. Coli 0128:B12、濃度100 ng/ml)とTNF溶液(濃度1.0 mg/ml)の混合溶液200 mlを流通させ、TNFの回収率及びバイロジェンの除去率を測定した。その結果、

TNFの回収率は95%であったが、バイロジェンの除去率は1.0%と殆ど除去されないことが判った。

#### (本発明の効果)

本発明のバイロジェン吸着剤は、バイロジェンの吸着選択性、及び吸着速度に優れている。又、リガンドを結合させたタイプではないので、使用中にバイロジェン吸着剤からリガンド等免疫疾患の原因になるようなものが脱離することもない。

従って、患者の血液や血漿等を上記のバイロジェン吸着剤に吸着させる本発明のバイロジェン除去方法は、敗血症に見られるエンドトキシンショックの患者の治療に特に有効である。

又、注射水やインターフェロン等の薬剤、或いは血液浄化器等の医療用機器の充填液の精製にも、本発明のバイロジェン除去方法は効果的であり、患者の発熱等の事故を大幅に減らすことができる。

特許出願人 宇部興産株式会社